

APR. - 6, 2005

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

平木 祐輔

様

あて名

〒 105-0001

東京都港区虎ノ門4丁目3番20号
神谷町MTビル19階

PCT

国際調査機関の見解書
(法施行規則第40条の2)
【PCT規則43の2.1】

発送日

(日.月.年)

05.4.2005

出願人又は代理人
の書類記号

PH-2364-PCT

今後の手続きについては、下記2を参照すること。

国際出願番号

PCT/J P 2005/000283

国際出願日

(日.月.年) 13.01.2005

優先日

(日.月.年) 15.01.2004

国際特許分類 (IPC)

Int. Cl¹

C12N15/11, C12N15/09, A01H5/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00

出願人 (氏名又は名称)

独立行政法人理化学研究所

1. この見解書は次の内容を含む。

- ☒ 第I欄 見解の基礎
- ☐ 第II欄 優先権
- ☐ 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
- ☒ 第IV欄 発明の単一性の欠如
- ☒ 第V欄 PCT規則43の2.1(a)(i)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- ☐ 第VI欄 ある種の引用文献
- ☐ 第VII欄 国際出願の不備
- ☒ 第VIII欄 国際出願に対する意見

2. 今後の手続き

国際予備審査の請求がされた場合は、出願人がこの国際調査機関とは異なる国際予備審査機関を選択し、かつ、その国際予備審査機関がPCT規則66.1の2(b)の規定に基づいて国際調査機関の見解書を国際予備審査機関の見解書とみなさない旨を国際事務局に通知していた場合を除いて、この見解書は国際予備審査機関の最初の見解書とみなされる。

この見解書が上記のように国際予備審査機関の見解書とみなされる場合、様式PCT/ISA/220を送付した日から3月又は優先日から22月のうちいずれか遅く満了する期限が経過するまでに、出願人は国際予備審査機関に、適当な場合は補正書とともに、答弁書を提出することができる。

さらなる選択肢は、様式PCT/ISA/220を参照すること。

3. さらなる詳細は、様式PCT/ISA/220の備考を参照すること。

見解書を作成した日

23.03.2005

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号特許庁審査官 (権限のある職員)
高 美 葉 子

4N

3335

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/ISA/237 (表紙) (2004年1月)

第1欄 見解の基礎

1. この見解書は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎として作成された。

- ☐ この見解書は、_____語による翻訳文を基礎として作成した。
それは国際調査のために提出されたPCT規則12.3及び23.1(b)にいう翻訳文の言語である。

2. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に不可欠なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき見解書を作成した。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

3. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

4. 補足意見：

第IV欄 発明の単一性の欠如

1. 追加手数料納付の求め（様式PCT/ISA/206）に対して、出願人は、

- ☒ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 追加手数料の納付はなかった。

2. ☐ 国際調査機関は、発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際調査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

配列番号2に示される塩基配列は、配列番号3に示される塩基配列を含んでいることから、配列番号3に示される塩基配列は、配列番号2に示される塩基配列の部分配列であると認められる。

請求の範囲1-10に係る発明の、配列番号1、2（又は3）、4のいずれかで示される塩基配列は、共通の化学構造を有するものでもなく、請求の範囲1-10に共通の事項は、「植物内でIRES(internal ribosome entry site)として機能するポリヌクレオチド」のみである。

しかしながら、文献1(WO 02/101006 A2 2002.12.19 & US 2003/0084482 A1 & JP 2004-535192 A)、文献2(WO 02/083867 A2 2002.10.24 & CA 2411649 A & US 2004/0014216 A1)、文献3(WO 03/012035 A2 2003.02.13 & US 2003/0084484 A1 & CA 2453178 A)には、植物内でIRESとして機能する配列番号4に示す塩基配列からなるDNAが記載されていることから、上記共通事項は先行技術の域を出るものではなく、「植物内でIRES(internal ribosome entry site)として機能するポリヌクレオチド」は、PCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえない。

すなわち、請求の範囲には、

- (1) 請求の範囲1、及び、請求の範囲4-10のうち配列番号1に関する部分
- (2) 請求の範囲2、及び、請求の範囲6-10のうち配列番号2又は3に関する部分
- (3) 請求の範囲3、及び、請求の範囲6-10のうち配列番号4に関する部分

の3発明が記載されている。

4. したがって、国際出願の次の部分について、この見解書を作成した。

- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 _____ に関する部分

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についてのPCT規則43の2.1(a)(i)に定める見解、
それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲		有 無
	請求の範囲	1-10	
進歩性 (IS)	請求の範囲		有 無
	請求の範囲	1-10	
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-10	有 無
	請求の範囲		

2. 文献及び説明

文献1: R, Z, AKBERGENOV, et. al., Nucleic Acids. Res. (2004.01.12), Vol.32, No.1, p.239-247
 文献2: WO 02/101006 A2 (ICON GENETICS, INC.) 2002.12.19 & US 2003/0084482 A1 & JP 2004-535192 A
 文献3: WO 02/083867 A2 (ICON GENETICS, INC.) 2002.10.24 & CA 2411649 A & US 2004/0014216 A1
 文献4: WO 03/012035 A2 (ICON GENETICS, INC.) 2003.02.13 & US 2003/0084484 A1 & CA 2453178 A
 文献5: JP 2003-070477 A (理化学研究所) 2003.03.11 (ファミリーなし)

【請求の範囲1、6-8、10】

請求の範囲1、6-8、10に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1から新規性を有さない。

文献1には、*Oryza sativa*の18S rRNA由来の10塩基からなるヌクレオチド(1073-1082番目)と β -glucuronidaseをコードする遺伝子を含むDNAコンストラクトが記載されており、該コンストラクトを用いて*Orychophragmus violaceus*のプロトプラストを形質転換する方法、及び、該方法を用いて得られた形質転換体が記載されている(第239頁ABSTRACT、第240頁Recombinant DNA constructs, Protoplast preparation and transient expression assay, Figure 1, Table 2参照。)

当該10塩基からなるヌクレオチド(1073-1082番目)は、本願の配列番号1に示す塩基配列と3塩基異なるが、本願明細書の[0023]を考慮すれば、請求の範囲1に記載の置換、欠失、付加及び挿入される「複数の塩基」とは、2-5個の塩基を意味することから、請求の範囲1に記載のポリヌクレオチドと当該10塩基からなるヌクレオチド(1073-1082番目)は、区別がつかない。

また、文献1では、該10塩基からなるヌクレオチド(1073-1082番目)は40S ribosomal subunitとの相互作用がほぼないものである、と結論しているが(第242頁左欄第26行-右欄第2行参照。)、該10塩基からなるヌクレオチド(1073-1082番目)によって40S ribosomal subunitとの相互作用がコントロールのものよりも7ポイント上昇し、 β -glucuronidaseの活性も13ポイント上昇していることから(Table 2参照。)、当該10塩基からなるヌクレオチド(1073-1082番目)は植物内においてIRES活性を有しているものと認められる。

したがって、請求の範囲1、6-8、10に係る発明と文献1に記載された発明は、区別がつかない。

【請求の範囲2、3、6-10】

請求の範囲2、3、6-10に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献2-4それぞれから新規性を有さない。

文献2-4には、本願配列番号3より5塩基短い、100%の相同性を有する塩基配列からなる、crucifer tobacco mosaic virusのゲノム由来のIRES (IRESmp75^{CT})と本願配列番号4と100%同一の塩基配列からなる

第Ⅷ欄 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

本願発明は、植物内でIRESとして機能するポリヌクレオチドに係るものであるが、具体的に本願発明のポリヌクレオチドがIRESとして機能することを確認したのは、アラビドプシス内のみである。

請求の範囲 1 に係る発明は、植物内でIRESとして機能する配列番号 1 に示す塩基配列からなるDNAを含むポリヌクレオチドであるが、具体的に明細書に開示され、植物内でIRESとして機能することを確認したポリヌクレオチドは、「配列番号 1 の塩基配列をスペーサー配列を介して 10 回繰り返したもの」と「配列番号 1 の塩基配列をスペーサー配列を介さずに直接 10 回繰り返したもの」であり、配列番号 1 の塩基配列を単独で（繰り返しなしで）用いたものが植物内でIRESとして機能することは開示されていない。

請求の範囲 3 に係る発明は、植物内でIRESとして機能する配列番号 4 に示す塩基配列からなるDNAを含むポリヌクレオチドである。

明細書の[0060]には、「IRESとして…(略)…配列番号 4 の塩基配列からなるものとを準備した。」という記載があるものの、明細書の[0074]に、「配列番号 1 の塩基配列をスペーサー配列を介さずに直接 10 回繰り返したDNAをIRESとして使用した場合、IRESの下流に存する蛍由来ルシフェラーゼの蛍光量が飛躍的に増大しており…(略)…配列番号 3 の塩基配列からなるDNAをIRESとして使用した場合にも、IRESの下流に存する蛍由来ルシフェラーゼの蛍光量が飛躍的に増大しており…(略)…」という記載、明細書の[0075]に、「配列番号 1 の塩基配列をスペーサー配列を介して 10 回繰り返したDNAをIRESとして使用した場合、及び配列番号 2 の塩基配列からなるDNAをIRESとして用いた場合には、IRESの下流に存する蛍由来ルシフェラーゼの蛍光量が僅かに増大しており…(略)…」という記載があるのみであることから、具体的に、配列番号 4 に示す塩基配列からなるDNAを含むポリヌクレオチドが植物内でIRESとして機能することは開示されていない。

[図 4]には、実施例 2 で作出したトランスジェニック植物における、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ及び蛍由来ルシフェラーゼの蛍光量を測定した結果が示されるものの、横軸の項目それぞれが、グラフ内の蛍光量を表すどのバーと対応しているのかが不明瞭である。

補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

第 V 欄の続き

crucifer tobacco mosaic virusのゲノム由来のIRES (IREScp148^{cr}) が記載されており、該IRESとプロモーターと遺伝子を含むポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを用いて形質転換した植物体、及び、該ポリヌクレオチドを用いて植物細胞内で導入した遺伝子を発現させる方法が記載されている。

本願明細書の[0030]を考慮すれば、請求の範囲2に記載の置換、欠失、付加及び挿入される「複数の塩基」とは、1～20個の塩基を意味することから、請求の範囲2に記載のポリヌクレオチドと文献2～4に記載のIRESm⁷⁵は、区別がつかない。

したがって、請求の範囲2、3、6-10に係る発明は、文献2～4それぞれに開示されている。

【請求の範囲3、6-10】

請求の範囲3、6-10に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献5から新規性を有さない。

文献5には、本願配列番号4より16塩基長い、本願配列番号4を有するIRES^{cp}が記載されており、該IRES^{cp}とルシフェラーゼ遺伝子を含むベクター、該ベクターを用いて形質転換したシロイヌナズナ、及び、該ポリヌクレオチドを用いて植物体内で導入した遺伝子を発現させる方法が記載されている（【0045】～【0046】、配列番号17参照。）。

本願明細書の[0034]を考慮すれば、請求の範囲3に記載の置換、欠失、付加及び挿入される「複数の塩基」とは、1～20個の塩基を意味することから、請求の範囲3に記載のポリヌクレオチドと文献5に記載のIRES^{cp}は、区別がつかない。

したがって、請求の範囲3、6-10に係る発明は、文献5に開示されている。

【請求の範囲1、4-10】

請求の範囲1、4-10に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1より進歩性を有しない。

文献1には、IRES活性を有する塩基であるARC-1を3～5回繰返し挿入したコンストラクトを用いて *O. violaceus*のプロトプラストを形質転換したところ、導入したCATの発現が上昇し、繰返す回数が増えるほどIRESの活性が上昇した旨記載されている（第244頁右欄第12行～第245頁左欄第12行、Table 5参照。）。

文献1のIRES活性を有する塩基配列の繰返す回数が増えるほどIRESの活性が上昇した旨の記載を考慮すれば、文献1に記載の *Oryza sativa*の18S rRNA由来の10塩基からなるヌクレオチド(1073-1082番目)を用いて外来遺伝子の発現を行う際に、発現効率をより高くしようとして、当該10塩基からなるヌクレオチド(1073-1082番目)を繰返し連結して用いることは、容易に想到し得ることである。また、最適な繰返し回数を決定することは、適宜設定し得る事項である。

また、当該10塩基からなるヌクレオチド(1073-1082番目)若しくはこれを繰返し連結したものと遺伝子を含むDNAコンストラクトを用いて、トランスジェニック植物を作製することに格別な困難性は認められない。

【請求の範囲6-10】

請求の範囲6-10に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1～5より進歩性を有しない。

上記したように容易に得られる、文献1に記載の10塩基からなるヌクレオチド(1073-1082番目)を繰返し連結したもの、若しくは文献1に記載の10塩基からなるヌクレオチド(1073-1082番目)そのものとプロモーターと遺伝子を含むベクターを作製し、該ベクターを用いて形質転換した植物体を作製すること、及び、該ベクターを用いて植物細胞内で導入した遺伝子を発現させることは、文献2～5の記載を考慮すれば、格別な困難性を有するものとは認められない。

補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

第 V 欄の続き

【請求の範囲 2、6-10】

請求の範囲 2、6-10 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献 2～4 より進歩性を有しない。

文献 2～4 に記載された IRESmp75^{cr} は、本願配列番号 2 に示された塩基配列の部分配列である。該 IRESmp75^{cr} の周辺配列を含んだポリヌクレオチドも IRES 活性を有するものと予測して、IRESmp75^{cr} の配列を基に crucifer tobacco mosaic virus ゲノムから、IRESmp75^{cr} と IRESmp75^{cr} の周辺配列を含んだポリヌクレオチドを取得し、IRES として用いることは、容易に想到し得ることである。

また、文献 2～4 の記載を考慮すれば、得られた IRES とプロモーターと遺伝子を含むベクターを作製し、該ベクターを用いて形質転換した植物体を作製すること、及び、該ベクターを用いて植物細胞内で導入した遺伝子を発現させることに、格別な困難性は認められない。